VERSUCHE ZUR KININOGENISOLIERUNG UND KININOGENSTABILISIERUNG

VERONIKA GOSSMANN

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546003_0046

Aus dem Klinisch-Chemischen-Institut an der Chirurgischen
Klinik der Universität München
Direktor : Professor Dr. Dr. E. Werle

Versuche zur Kininogenisolierung und Kininogenstabilisierung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Veronika Goßmann

München
1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter : Priv.Doz.Dr.K.Hochstraßer
2. Berichterstatter : Prof.Dr.Dr.E.Werle
Dekan : Prof.Dr.W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. W e r l e möchte ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes meinen herzlichsten Dank aussprechen.
Herrn Priv.Doz. Dr. K. H o c h s t r a ß e r danke ich sehr herzlich für die freundliche Unterstützung und die jederzeit bereitwillig gewährten Ratschläge.

Inhaltsverzeichnis :

A.	Vorkommen und Bedeutung von Kininogen	1
I.	Geschichte der Kininogenentdeckung	1
	Entdeckungen von Frey und Werle	1
	Beobachtung von Rocha e Silva	1
II.	Vorkommen der Kininogene	3
III.	Nachweis und Wirkung der Kininogene	4
IV.	Kininwirkungen	6
B.	Problematik der Kininogenisolierung	8
I.	Definition von Kininogen	8
II.	Gründe der Kininogenisolierung	8
III.	Bisherige Versuche zur Kininogenisolierung	9
	1. Methoden	9
	2. Diskussion	12
C.	Experimenteller Teil	15
I.	Ergebnisse der Versuche zur Kininogenisolierung und Stabilisierung	16
II.	Beschreibung der Versuche	23
	1. Material und Methoden zur Isolierung des polyvalenten Proteaseninhibitors aus Kartoffeln	23
	2. Testung auf Kininogengehalt durch Freisetzung von Kinin mit Trypsin	24
	3. Ammoniumsulfatfällung	27
	4. Reinigung über Sephadex G-75	28

5. Anreicherungsversuch über DEAE-Cellulose 30
6. Stabilisierungsversuche mit Metallkomplexbildnern 33
7. Stabilisierungsversuch mit Schwermetallionenzusatz 34
8. Stabilisierungsversuch durch Ausschalten der Wirkung von Carboxypeptidase B 35
9. Stabilisierungsversuch durch spezielle Ausschaltung chymotrypsinartiger Enzyme 36
10. Stabilisierungsversuch mit TLCK 37
11. Versuche, die einen enzymatischen Prozess bei der Inaktivierung ausschließen 38
12. Nochmalige Ammoniumsulfataussalzung 39
13. Rechromatographie an DEAE-Cellulose und nochmalige Stabilisierungsversuche durch Rühransätze mit den in Punkt 6-10 beschriebenen Substanzen 40
14. Freisetzung von Kinin, Papierchromatographie und Aminosäureanalyse 41

D. Zusammenfassung 42

Literaturverzeichnis 43

A : Vorkommen und Bedeutung von Kininogen

I. Geschichte der Kininogenentdeckung :

Das von Frey 1926 bei der intravenösen Injektion von Harn aufgefundene blutdrucksenkende Prinzip wurde ursprünglich als neues kreislaufaktives Hormon aufgefaßt.
Erst Werle konnte 1936 nachweisen, daß diese, wegen ihres Hauptvorkommen's im Pankreas, als K a l l i k r e i n bezeichnete Substanz erst Kreislaufaktivität zeigt, wenn sie mit Blutplasma in Berührung kommt. Er untersuchte die Wirkung von Harnkallikrein am isolierten Hundedarm und fand deutliche Kontraktionen (1). Bei der Vorinkubation dieses Harnkallikrein's mit Serum jedoch wurde diese Kontraktionswirkung um ein vielfaches gesteigert und ihr Wirkungseintritt zudem beschleunigt (2).

Werle schloß, daß im Serum ein Substrat vorhanden ist aus dem Kallikrein enzymatisch einen Stoff freilegt, der darmkontrahierende Wirkung besitzt. Dieser Wirkstoff wurde K a l l i d i n genannt und seine Vorstufe im Serum K a l l i d i n o g e n .

Eine zweite Beobachtung wurde von Rocha e Silva 13 Jahre später gemacht : Mit Trypsin und Schlangengift inkubiertes Serum zeigt am isolierten Meerschweinchendarm eine deutliche Kontraktionswirkung, die langsamer einsetzt und sich langsamer verstärkt, als die Wirkung von Histamin und Acetylcholin und die er deshalb B r a d y k i n i n nannte (3).

Auf Grund der enzymatischen Freisetzung und gleichartigen Wirkung dieser Substanzen war lange Zeit ihre Identität nicht auszuschließen.

Nachdem die Peptidnatur beider Substanzen erkannt war erfolgte in den Jahren 1960-62 die Isolierung, Sequenzanalyse und Synthese.

Bradykinin ist ein Nonapeptid (s. Schema 1), Kallidin unterscheidet sich von ihm durch einen Lysylrest am Aminoende der Kette, ist also ein Dekapeptid.

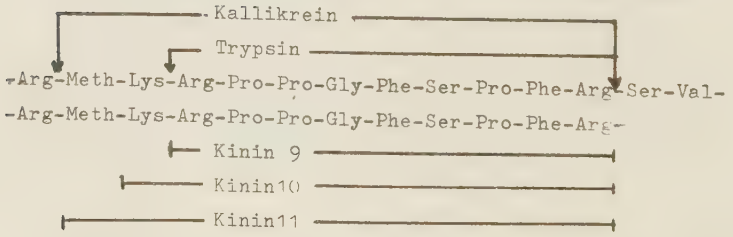
Illiot inkubierte Rinderserum bei niedrigem pH und erhielt neben Bradykinin und Kallidin eine dritte, biologisch aktive Komponente, die sich als M e t h i o n y l k a l l i d i n erwies (6).

Heute bezeichnet man diese aus dem Blutplasma freisetzbaren, hypotensiven und darmkontrahierenden Substanzen allgemein als K i n i n e und ihre entsprechenden, inaktiven Vorstufen K i n i n o g e n e und die Enzyme, die aus Kininogen Kinin freisetzen K i n i n o g e n a s e n .

Zwei kininogene wurden bisher im Plasma gefunden. Man bezeichnet sie als Kininogen I und II (Habermann 1963; Pierce und Webster 1966; Nagasawa u.Mitarb. 1966; Vogt und Mitarb. 1967)

Es gibt eine Reihe Kinin freisetzender Enzyme, wie Trypsin, Kallikreine und Bakterienproteasen, sowie durch Glas oder Aceton aktivierbare, endogene Plasmakallikreine.

Schema 1 : **Sequenz der verschiedenen Kinine und Angriffspunkte der kininliberierenden Enzyme Kallikrein und Trypsin**



II. Über [illegible] Kininogene :

Kininogene findet man vor allem im Blutplasma. Einige Werte für den Kininogengehalt des Plasmas von Menschen und von Tieren gibt folgende Tabelle, die nach den Untersuchungsergebnissen von Diniz und Carvalho (7) zusammengestellt ist.

Tab. 1 Mittelwerte an Kininogen im Plasma angegeben in µg freisetzbares Bradykinin pro ml Plasma

Mensch	10,6
Rind	14,5
Pferd	9,5
Hund	6,0
Kaninchen	11,1
Meerschweinchen	8,9
Ratte	2,0
Huhn	Spuren

Unter gleichbleibenden Bedingungen soll der Kininogengehalt bei ein und demselben Menschen über Wochen nur geringen Schwankungen unterliegen (8).
Der Kininogengehalt von Neugeborenen liegt nach Untersuchungen von Periti und Gasparri deutlich unter dem der Erwachsenen (9).

Elektrophoretisch findet sich das Kininogen beim Menschen in der α_2-Globulinfraktion (12)
Im Rinderplasma wandert es mit der α_1-Globulinfraktion (13).

Bei Kallikreininfusionen (10), Hypoxie und lokaler Ischämie (11) kommt es zu einem Abfall des Kininogenspiegels im Plasma.

III. Nachweis und Wirkung der Kininogene :

Kininogen hat als inaktive Vorstufe des Kinin' s keine darmkontrahierende und gefäßerweiternde Wirkung und kann deshalb nur durch enzymatische Freisetzung von Kinin als solches nachgewiesen werden.
Die meßbare Kininaktivität des getesteten Plasma' s hängt weitgehend von der verwendeten Kininogenase und der analytischen Technik ab, vgl. Tabelle 2

Tab. 2 Bei Verwendung verschiedener Kininogenasen gefundener Kininogengehalt pro ml Serum in µg Bradykinin beim Menschen(8):

Pankreaskallikrein	2,6
Speichelkallikrein	2,8 - 4,5
Plasmakallikrein	0,5 - 1,0
Trypsin	15,0- 20,0
Säurebehandlung	4,4
Glasaktivierung	1,1

Die Konzentrationsangabe erfolgt in µg freisetzbares Kinin, wobei Trypsin oder Pankreskallikrein als Kininogenase dienen. Die Serum eigenen Kininasen und Kininogenasen werden durch Säure- und Hitzevorbehandlung inaktiviert.
Die Unterschiede in der Kininausbeute mit Trypsin und Pankreaskallikrein lassen sich durch die verschiedene Substratspezifität beider Enzyme erklären (14), aber auch durch die verschiedenstarke Wirkung der dabei entstehenden Kinine Kallidin und Bradikinin, vgl. Tab. 3
Bei Verwendung nativer Seren mit Zusatz von Kininaseinhibitoren ergeben sich im Vergleich zu säurebehandelten Seren geringere Kininausbeuten mit Trypsin, jedoch höhere mit Kallikrein (8)

Tab. 3 Aktivitätsvergleich zwischen Bradykinin, Kallidin, Metionylkallidin (Auszug aus Tab. 25 in "Das Kallikrein-Kinin-System u. seine Inhibitoren von FREY, KRAUT u. WERLE)

Testobjekt	Bradykinin =Kinin 9	Kallidin =Kinin10	Met-Kallidin =Kinin 11
Isol. Rattenuterus	1oo	6o	3o
Isol. Meerschweinchenileum	1oo	25-4o	25-35
Blutdruck Katze	1oo	5o-7o	25-3o
Kappilarpermeabilität	1oo	1oo	-
Bronchokonstriktion	1oo	3o-35	25

Gibt man zu einem isolierten Testorgan Kallikrein, so zeigt sich keine Wirkung, da das Kallikreinsubstrat Kininogen fehlt.

Das Wechselspiel der Kininogenasen und Kininasen ist im Organismus für den Wirkungseintritt und die Wirkungsdauer verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein biologisches Gleichgewicht.
Die Konzentrationen der aktiven Kinine in Blut und Geweben sind dabei nahezu unmeßbar gering, infolge der großen Inaktivierungskapazität des Blutplasma's (8).
WERLE und Mitarb. stellten 1950 fest, daß vor allem Carboxy- und Aminopeptidasen dabei wirksam sind(15).

ERDÖS hat sich vor allem weiterhin sehr eingehend mit der Charakterisierung und Identifizierung von Kininasen beschäftigt (16).

IV. Kininwirkungen :

Die Hauptwirkung des Gewebshormons Kinin beruht auf direktem Angriff an glatter Muskulatur von Gefäßen und Organen. An Gefäßen tritt eine V a s o d i l a t a t i o n ein. Sie bewirkt eine Steigerung der Organdurchblutung. Bei Messungen an Gehirnhäuten wurden Kinine als potenteste vasodilatatorische Substanzen gefunden.(17) Besondere Bedeutung kommt der Durchblutungssteigerung an Drüsen zu : Kinine bewirken eine Erhöhung der Salivation (18), Schweißbildung (19) und Sekretion endokriner Drüsen (20). Weiter werden Dilatation der Coronarien (21), vermehrte Durchblutung der Nasenschleimhaut (22), der Lunge (23), der Nieren (24), des Splanchnikusgebietes (25), der Muskulatur (26) und Teile der Haut (27) beschrieben.

Als pathologische Reaktion bei Störung des biologischen Gleichgewichtes durch Entzündungsreize kommt es zu Blutdruckabfall und den auf Gefäßerweiterung beruhenden Entzündungserscheinungen, die außerdem durch Steigerung der Venen- und Kapillarpermeabilität als Kininwirkung in Form einer morphologischen Auflockerung der Kittleisten des Endothels (28) verstärkt werden. Eine Potenzierung des Schwartzmann-Phänomens, die Aktivierung des Endotoxinschocks, der Schock bei Pankreatitis werden der blutdrucksenkenden Wirkung der Kinine bei Ausfall der Steuerungsmechanismen zugeschrieben.

Kinin wurde sogar als hauptverantwortlich für die Entzündung diskutiert (29). Es übertrifft Histamin und Serotonin in der Intensivität und Promptheit der Entzündungsreaktion (30).

Die Ursache für verstärkte Kininfreisetzung durch Entzündungsreiz wird gesehen in :

a, Aktivierung des Kininsystems im sauren Milieu zerstörten gewebes durch saueren Stoffwechselmetaboliten (31). In Entzündungsgebieten wurden pH-Werte bis unter pH 6 gemessen (32).

b. erhöhter Aktivitätsabfall von Kininasen in leicht saurem Milieu bei gleichbleibender Kininogenasewirkung (33).

An Uterus (34), Magen-Darm (35) und Bronchien wird eine erregende Wirkung von Kinin, eine Kontraktionswirkung auf diese Organe gefunden.
Pathologische Kininwirkung sehen wir beim Carcinoid, das klinisch mit starken Diarrhoen einhergeht und bei asthmoidem Bronchospasmus (36).
Die kontrahierende Wirkung auf Darm- und Uterusmuskulatur wird an isolierten Darm- oder Uruspräparaten der Ratte oder anderer Tiere zum Nachweis von Kinin genutzt.

Im Nervensystem stimuliert Kinin zentral parasympathische Zentren (37), indem es Acetylcholin freisetzt. Peripher wirkt es als nicht nikotinartiges, ganglienstimulierendes Agens. Weiter dürfte eines der Kinine mit der 'pain-producing-substance' identisch sein. Die Schmerzen können aus zwei Gründen entstehen: Einmal durch eine Erniedrigung der Schmerzschwelle oder durch direkte Reizung der Schmerzrezeptoren. Für Kinine werden beide Mechanismen diskutiert.(38) Vaskuläre Kopfschmerzen vom Migraine-Typ sind bedingt durch die beiden Wirkungen von Kinin als Vasodilatator und als 'pain-producin-substance'.

Kinine verursachen weiterhin eine Leukozytose, wie Cardoso und Mitarbeiter bei intravenöser Bradykininapplikation nachwiesen(39). Sie hemmen die oxydative Phosphorylierung von Lebermitochondrien (40), und beeinflussen das Blutgerinnungssystem (41).

Um einen Einblick in die Kinetik der Kininfreisetzung zu gewinnen braucht man stabiles, möglichst reines Kininogen.

B : Problematik der Kininogenisolierung

I. Definition von Kininogen :

Als Kininogene bezeichnet man Proteine, aus denen durch Inkubation mit Kininogenasen Kinine freilegbar sind.

Das Kininogen des Blutplasma's ist ein saures Glykoproteid(42). Es wandert bei der Elektrophorese im Bereich der α_2-Globuline. Sein Isoelektrischer Punkt liegt bei pH 3,3 - 3,6 .

II. Gründe der Kininogenisolierung :

Die Kininliberierung ist ein proteolytischer Vorgang.
Um nachweisen zu können, welche Peptidbindungen bei der Kininliberierung gelöst werden, bemühten sich mehrere Arbeitskreise um die Reindarstellung von Kininogen.
Dabei wurden zwei Wege eingeschlagen:

1. Versuche zur Isolierung von n a t i v e m , h o c h m o l e k u l a r e m Kininogen.
   Dieser Weg hatte bisher keinen großen Erfolg, da es durch Kininogenasen im Blutplasma zu großen Verlusten kommt.

2. Versuche zur Isolierung von K i n i n o g e n b r u c h s t ü c k e n durch Säure-oder Hitzedenaturierung und nach folgender Pepsininkubation, aus denen durch Kallikreininkubation noch Kinin freilegbar ist.
   Dieser Weg hat infolge der vorausgehenden Inaktivierung von Kininogenasen und Kininasen den Vorteil einer größeren Ausbeute an Kinin, jedoch lassen sich infolge des verschiedenen Ausgangsmaterials an niedermolekularen Kininogenen keine sicheren Aussagen machen über die Kinetik der Kininfreisetzung in vivo.

III. Bisherige Versuche zur Kininogenisolierung :

1. Methoden :

a, Fraktionierung der Serumproteine durch Ammoniumsulfatfällung :

ROCHA E SILVA arbeitete schon 1949 nach dieser Methode Serum auf , SUZUKI u. KATO haben 1967 diese Methode wieder aufgegriffen und bisher alle ihre Kininogene auf diese Weise angereichert. Als weiterer Schritt folgt dann eine Hitzedenaturierung , der bei ihren letzten Isolierungsversuchen (1969/70) durch eine Zink-Acetat-Fällung ersetzt wird.

b, Fraktionierung der Serumproteine nach Cohn :

HABERMANN u. MITARB. haben vor allem nach diesem Verfahren ihre Kininogenpräparate isoliert. Als weitere Anreicherungsschritte folgen dann Trennungen über Hydroxylapatit und Sephadex Gele.

c, Isolierung von Kininogenbruchstücken durch Inkubation von Serum mit Pepsin :

CROXATTO stellt schon 1955 fest, daß man durch Inkubation von Serum mit Pepsin Peptide erhält, die eine Angiotensin- und Pepsitocinwirkung besitzen und die Diurese hemmen.
HOCHSTRASSER u. WERLE ließen auf peptische Spaltprodukte von Rinderserum Trypsin einwirken und konnten dadurch Kinin freisetzen.(43) Man erhält also durch Pepsineinwirkung auf Serum " niedermolekulare Kininogene", d.h. Kininogenbruchstücke, aus denen noch alles Kinin freilegbar ist.

d, Isolierung von Kininogenbruchstücken durch Serumbehandlung mit BrCN :
AXEN u.MITARB. (44) 1966 und HABERMANN u. HELSIG (45) 1967 arbeiteten Rinderplasma mit BrCN auf und isolierten niedermolekulare Kininogene.

Tab. 4 Unterscheidungskriterien bisher isolierter Kininogene (46)

Serum von	unterschiedliche Eigenschaft	Untersucher
Rind	Substrat von Kinin 9 u. Kinin 10 Enzymen	Habermann u.Blennemann (1964)
Rind	Molekulargewicht nach Gelfiltration	Habermann u. Mitarb. (1963)
Rind	Substrate von Serum-Kallikrein und anderen Enzymen	Suzuki u.Mitarb. (1967)
Mensch	Molekulargewicht nach Gelfiltration	Brocklehurst u. Mawer (1966)
Mensch	Empfindlichkeit gegen Carboxypeptidase B und BrCN, Verhalten bei der Elektrophorese u. Chromatographie	Pierce u.Webster (1966); Axen u.Mitarb.(1966); Pierce (1968)
Pferd	Empfindlichkeit gegen Serumkallikrein und andere Enzyme	Henriques (1967)
Verschiedene	Molekulargewicht, elektrophoretisches Verhalten, Empfindlichkeit gegen verschiedene Kininogenasen	Jakobsen(1966); Margolis u.Bishop (1963);Vogt(1966) Eisen(1966); Gautvik(1969)

Tab. 5 Sequenzunterschiede um den aktivierbaren Bereich bisher isolierter Kininogenbruchstücke :

Methode	Sequenz	Untersucher
Pepsininkubation	Gly-Arg-Met-Lys-(Kinin 9)	Hochstraßer u. Werle (1967)
	Ser-Arg-Met-Lys-(Kinin 9)	
Pepsininkubation	-Met-Lys-(Kinin 9)-Ser-Val-GluNH$_2$-Val-Met-	Habermann (1965)
	-Met-Lys-(Kinin 9)-Ser-Val-GluNH$_2$-	
BrCN-Behandlung	-Lys-(Kinin 9)-Ser-Val-GluNH$_2$-Val-HoSer	Habermann u. Helbig (1966)
	-Lys-(Kinin 9)-Ser-Val-GluNH$_2$-Val-HoSer Lacton	

2. Diskussion :

Wie die beiden Tabellen 4 und 5 zeigen, liegen mehrere Beobachtungen vor, die auf das Vorkommen verschiedener Kininogene hindeuten.
Bei der Bestimmung des Kininogengehaltes im Rinderserum vor und nach Vorinkubation mit Carboxypeptidase B fanden Hochstrasser und Werle 1966 (47), daß im vorinkubierten Rinderplasma nur halb soviel Kinin freilegbar ist, wie ohne Vorinkubation mit Carboxypeptidase B. Suzuki und Kato konnten 1968 diesen Befund bestätigen (48).
Daraus wurde geschlossen, daß zwei Kininogene vorliegen. Beim einen liegt die Kininsequenz am Carboxylende des Kininogens, beim anderen befindet sie sich innerhalb der Molekülkette und ist so gegen Carboxypeptidase geschützt.

Habermann erhielt 1963 bei der Kininogenisolierung über DEAE-Sephadex zwei aktive Kininogenfraktionen. Anfänglich charakterisierte er das eine Kininogen als ein höher molekulares Kininogen. Bei genauerer Untersuchung wurde allerdings festgestellt, daß es durch Denaturierungsschritte, wie Hitzebehandlung und Säurefällung zu Dimerisierung des nativen Kininogens (49) kommt, was zwei aktive Peaks bei der Säulenelution ergeben kann.

Bei der Aufarbeitung von peptischen Spaltgemischen wurden von verschiedenen Arbeitskreisen verschiedene Kininogene isoliert. Tab.5 zeigt die Sequenz der isolierten Kininogenspaltprodukte, die alle die Kininsequenz enthalten.
Durch Behandeln mit Carboxypeptidase B konnte gezeigt werden, daß die von Hochstraßer und Werle isolierten, niedermolekularen Kininogene keine , am Carboxylende nicht zur Kininsequenz ge-

hörenden Aminosäuren enthalten, da infolge der Abspaltung von Arginin durch Carboxypeptidase B der Kininogencharakter der niedermolekularen Kininogene verloren geht. HOCHSTRASSER u. WERLE fanden weiter, daß bei Inkubation dieser Kininogenspaltprodukte mit Kallikrein neben zwei Dipeptiden Ser-Arg und Gly-Arg Methionylkallidin entsteht. Durch Inkubation mit Trypsin konnten sie weiter dieses Methionylkallidin unter Abspaltung des Dipeptides Meth-Lys in Bradykinin überführen.
HABERMANN fand bei der Aufarbeitung seiner peptischen Spaltprodukte zwei kininliefernde Peptide, die am Carboxylende noch die Aminosäuren Ser-Val-GluNH_2 enthielten. Durch schrittweisen Abbau mit Carboxypeptidase B erhielt er Methionylkallidin, ebenso durch Einwirken von Kallikrein.

Die von HOCHSTRASSER u. WERLE und HABERMANN erarbeiteten Ergebnisse scheinen sich bei oberflächlicher Betrachtung zu wiedersprechen, ergänzen sich jedoch sehr gut. Es kann allgemein angenommen werden, daß innerhalb der Peptidkette der verschiedenen Kininogene die Kininsequenz einmal carboxylendständig oder mit verlängerter Carboxylsequenz vorliegen kann. Kombiniert man die Ergebnisse von Hochstraßer und Habermann, so können Verhältnisse im Bereich der Kininsequenz der verschiedenen Kininogene angenommen werden, wie in Schema 2 dargestellt.

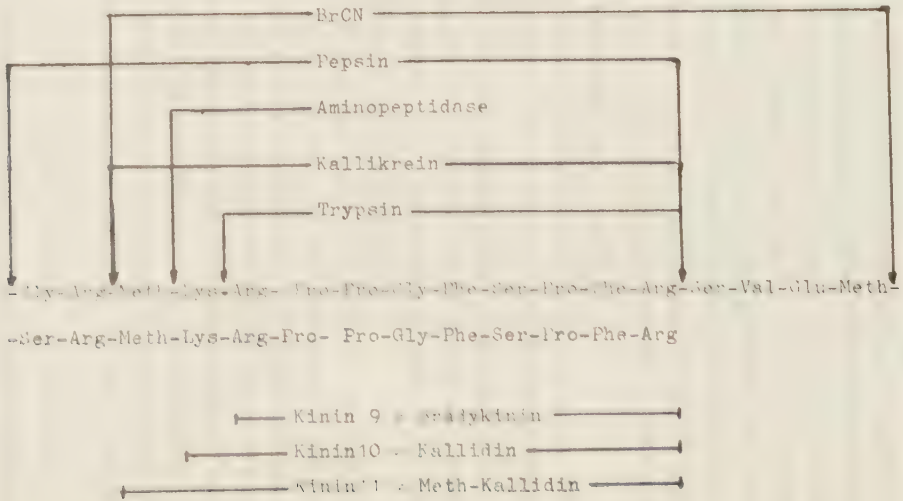
Diese Befunde, gewonnen aus niedermolekularen Kininogenen bestätigen die Vermutungen auf zwei verschiedene Serumkininogene.

Auch Untersuchungen von VOGT(50) deuten auf das Vorliegen von zwei verschiedenen, nativen Kininogenen im Serum hin. Es gelang, zwei verschiedene Serumkallikreine nachzuweisen,

die sich dadurch unterscheiden, daß jeweils eine Komponente in der Lage ist, nur etwa die Hälfte der im Plasma vorhandenen Kininmenge freizulegen. Der Rest ist durch eine zweite Kallikreinform freilegbar. Die Zuordnung der beiden Kallikreine zu den bisher isolierten Kininogenen gelang bisher HOCHSTRASSER nicht. Es ist jedoch mit zwei Kallikreinen von verschiedenen Substratspezififitäten zu rechnen, wobei die eine Kallikreinform nur in der Lage ist, durch Lösen einer Arg-Meth-Bindung das carboxylendständige Kinin freizulegen, während die andere Form durch Lösen von zwei Arg-X-Bindungen das innerhalb eines längeren Peptidverbandes lokalisierte Kinin freilegen kann.

Um die Aussagekraft über die einzelnen Vorstufen und Stufen in dem Kininogen-Kinin-Regelkreis weiter zu klären war es erforderlich, die Isolierung von nativem, stabilem Kininogen zu versuchen, um damit die spezifische proteolytische Wirkung des Kallikreins auf ein definiertes Substrat näher zu untersuchen.
Im folgenden experimentellen Teil wurde an Hand der ausgeführten Überlegungen und bisherigen Ergebnisse versucht ein stabiles, keinem Denaturierungsschritt unterzogenes, möglichst angereichertes Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zu gewinnen.

Schema 3 Verhältnisse im Bereich der Kininsequenz der durch die verschiedenen Isolierungsverfahren zur Gewinnung von niedermolekularen Kininogenen entstandenen Kininogenbruchstücke :



B : Experimenteller Teil

I. Ergebnisse der Versuche zur Kininogenisolierung und Stabilisierung :

Wir wählten zur Fraktionierung von Rinderserum die Ammoniumsulfataussalzung. Suzuki hatte bei diesem Isolierungschritt große Verluste (vgl.Tab.6), obwohl er in der Kälte bei 4°C arbeitete. Auch wir hatten in Vorversuchen Verluste bis zu 80%. Da die bei der Ammoniumsulfatausalzung gewonnene kininogenhaltige Fällung noch Kininogenasen und Kininasen enthält, ist das gewonne Material unstabil und muß sofort einem Denaturierungsschritt unterzogen werden, Erhitzung z.B., um eine weitere Inaktivierung zu verhindern.
Einen Denaturierungsschritt wollten wir jedoch vermeiden, um ein natives Kininogen zu erhalten, aus dem man nach weiterer Anreicherung,mit Serumkallikrein Kinin freisetzen kann.

Versuche mit Zusatz von Trasylol^{R}, einem polyvalenten Proteaseninhibitor zeigten keine Verbesserung der Kininogenausbeute bei der Ammoniumsulfatfällung.

Hochstrasser hatte 1969 einen polyvalenten Proteaseninhibitor aus solanum tuberosum isoliert und charakterisiert. (56).
Bei Säulenchromatographie lassen sich die Kartoffelknollenextrakte in drei inhibitorisch aktive Komponenten auftrennen, die jedoch alle das gleiche Hemmspektrum haben. Sie hemmen außer Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin auch noch Serumkallikreine, verhindern eine Kallikreinaktivierung durch Glaskontakt und verlängern die Blutgerinnungszeit durch Blockade des Hagemannfaktors, wie Hochstrasser bei seinen Untersuchungen fand.

Vorversuche mit Zusatz von Kartoffelextrakt bei der Ammoniumsulfatfällung ergaben, daß das Kininogen voll aktiv und stabil bei Zimmertemperatur ausgesalzt wird.

In Großansätzen arbeiteten wir mit dem Kartoffelextraktzusatz 40l Rinderserum auf. Das gefällte Material war voll aktiv und blieb auch bei der 24 stündigen Dialyse gegen fließendes Leitungswasser stabil. Die weitere Reinigung erfolgt durch Gelfiltration an Sephadex G-75. Kininogen ist in den coeruloplasminhaltigen Fraktionen, wie die Austestungen ergaben. Diese sind grün gefärbt. Es wurden deshalb bei den Gelfiltrationen über Sephadex G-75 nur die grüngefärbten Fraktionen gesammelt. Nach zweimaliger Gelfiltration unseres Materials hatten wir eine Aktivität von 1,3 KI / mg Protein.
Bei allen Isolierungsschritten wurde Kartoffelinhibitor in einer Konzentration von 20 ImU / 1 KI Aktivität des Kininogenmaterials zugesetzt.

Tab. 6 Vergleichswerte des Aktivitätsverlustes bei Isolierungsschritten bis zur Säulenchromatographie an DEAE - Cellulose, von der Arbeitsgruppe Suzuki und von unseren Untersuchungen:

Isolierungsschritt	Suzuki % Ausbeute	unsere Ergebnisse mit Inh.	ohne Inh. der Ausgangsaktivität
Ammoniumsulfatfällung	34%	95%	20 - 40%
n.Dialyse	-	95%	10 - 20%
n.Erhitzen	8,5%	-	-
n.Gelfiltration an Sephadex G-75	-	90%	-
v.DEAE-Cellulose	8,5%	90%	-

Als Ausgangsmaterial für die Weiterisolierung über Ionenaustauscher hatten wir also im Gegensatz zu den bisherigen Isolierungsverfahren ein stabiles rel. hoch angereichertes Präparat.
Bei Vorversuchen zur Wahl des Ionenaustauschers mit CM-Cellulose , DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex war bei allen ein

Aktivitätsverlust der aufgegebenen Kininogenmenge von 60 - 80% festzustellen. DEAE-Cellulose hatte mit 40% die beste Ausbeute. Wir isolierten deshalb mit DEAE-Cellulose weiter.
Als Ursachen für den relativ hohen Aktivitätsverlust sind diskutierbar: a, ein Teil des Kininogens wird unter den angewandten Bedingungen nicht aus dem Harz eluiert.

, durch den Ionenaustauscher werden Kininogenasen, die nicht durch den Inhibitor hemmbar sind aktiviert. Aus Kininogen kann dadurch Kinin freigestzt werden, das durch Kininasen inaktiviert wird.

c, das Kininogen durch katalytische Wirkung des Ionenaustauschers verändert und intaktes Kinin kann nicht mehr freigesetzt werden.

Um zu prüfen, welche der diskutierten Möglichkeiten für die Aktivitätsverluste verantwortlich sind prüften wir zuerst, ob aus dem basischen Ionenaustauscher bei niedrigem pH (0,1 M Zitronensäure-puffer pH 5,0) Kininogen eluiert werden kann. Im Eluat konnten wir jedoch kein aktives Kininogen feststellen. Um weiter zu prüfen, ob etwa ein irreversibler Komplex zwischen Kininogen und Harz vorliegt, inkubierten wir Trypsin 20 min. mit dem Harz. Es ist kein Kinin freisetzbar.

Um eine enzymatische Inaktivierung durch Kininogenasen und Kininasen auszuschließen oder zu bestätigen setzten wir bei unserem Isolierungsschritt über DEAE-Cellulose verschiedene gegen Kininogenasen und Kininasen inhibitorisch wirkende Substanzen zu.

1. EDTA :Äthylendiamintetraessigsäure bildet Metallionenchelate. Kininasen als Metalloenzyme werden dadurch gehemmt. Armstrong(57), Erdös(58) Ferreira(59), Aarsen(60) und Dryud(61) stellten in verschiedenen Plasmafraktionen von Mensch und Tier eine Hemmung der Kininasenaktivität durch Anwendung von EDTA fest.

Phenanthrolin: Nach G.Garbe (62) ist Orthophenanthrolin zur Blockade von Kininasen am besten geeignet. Phenanthrolin ist wie EDTA ein Metallkomplexbildner. Erdös und Mitarb.(63) beschrieben die Hemmung einer Prolinaminopeptidase, die Bradykinin N-terminal abbaut, durch Phenanthrolin, die aber nicht durch EDTA inaktiviert werden kann.

Die beiden Schwermetallkomplexbildner konnten jedoch die Inaktivierung unseres Präparates bei Kontakt mit dem Ionenaustauscher nicht verhindern.

2. Schwermetallionen : Amundsen und Nustad(64) beschrieben die Inaktivierung von Kininasen durch Zusatz von Schwermetallionen bei Untersuchungen der Speicheldrüsen auf Kiningehalt. Wir setzten deshalb unseren Eluationspuffern HgCl, PbCl, und CdCl in Konzentrationen von 0,001 M zu. Auch dabei konnten wir keine Kininogenstabilisierung feststellen.

3. Verhinderung des Abbaus durch Carboxypeptidase B. : Hochstrasser und Werle fanden 1966, daß nach Vorinkubation von denaturiertem Plasma mit Carboxypeptidase B die mit Trypsin freilegbare Kininmenge um 40% vermindert wird. Erdös u.Sloane haben 1962 eine Carboxypeptidase N charakterisiert. Sie ist der Carboxypeptidase B des Pankreas ähnlich und spaltet die Ph^{8}- Arg^{9} -Bindung des Bradykinin's. Diese Befunde legten die Vermutung nahe, daß die Verluste an freilegbarem Kinin durch die Wirkung von Carboxypeptidasen verursacht werden könnten. Zum Schutz der freien Carboxylgruppen modifizierten wir sie durch Einführung eines Aminosäurerestes nach der von Hoare und Koshland (65) beschriebenen Methode.

Auch dieser Versuch eine Inaktivierung des Kininogens zu verhindern brachte keine Verbesserung der Ausbeute.

4. Schöll mann und Shaw (66), Severin u.Tomasek(67) und Whitaker u.Villaseñor(68) beschrieben die Wirkungshemmung von Trypsin,Chymotrypsin und Papain durch die Chloromethylketone TPCK u.TLCK. : Durch Angriff in den aktiven Zentren der Proteasen hemmen sie deren Wirkung. Um einen enzymatischen Kininogenabbau durch TPCK und TLCK inaktivierbare Enzyme auszuschließen, setzten wir unserem Material vor Säulenaufgabe diese Substanzen zu. Eine Hemmung wurde gefunden. Die eluierten Fraktionen zeigten keinen so hohen Verlust wie bisher. Bei mehrfachen Säulenläufen fanden wir Ausbeuten von 70 %. Jedoch waren die Präparate nicht stabil, sodaß wir nach Dialyse nur eine unwesentlich höhere Kininogenaktvität fanden, als bei den in den Vorversuchen gewonnenen Präparaten(vgl. Tab.7)

Nachdem durch die verschiedenen Hemmversuche mit bisher bekannten Kininogenasen und Kininaseninhibitoren eine Inaktivierung durch diese Enzyme ausgeschlossen wurde, machten wir weitere Versuche, um eine enzymatischen Abbau auszuschließen.
Werden bei dem Kontakt mit dem Ionenaustauscher Kininogenasen aktiviert, so müßten die Kininogenhaltigen Eluate synthetisches Braykinin oder unser stabiles Ausgangsmaterial abbauen.
Nach Inkubation dieser Eluate mit stabilen Kininogen, bzw. Kinin war jedoch kein Aktivitätsverlust gegenüber Leerwerttestungen festzustellen.

Da wir durch die Säulenchromatographie mit DEAE-Cellulose infolge der hohen Verluste zu keiner wesentlichen Anreicherung des Kininogens kamen versuchten wir durch eine nochmalige fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eine Anreicherung zu erzielen.

Tab. 8: Ergebnisse der Stabilisierungsversuche mit Kininogenasen und Kininen hemmstoffen bei DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie :

	Verlust in % der aufgegebenen KI-Menge nach DEAE-Cellulose.	nach Dialyse	Anreicherung
ohne "Stabilisator"	60%	65%	1,4 Kl/mg
EDTA	55%	65%	1,4
Phenanthrolin	50%	60%	1,5
Schwermetallionen	55%	60%	1,5
Glycinester	50%	60%	1,5
Leucinester	55%	60%	1,5
TPCK	30 - 35%	50%	1,7
TLCK	45 - 50%	55%	1,6

Die Aussalzung erfolgte in 8 Schritten. Die Niederschläge wurden getestet. Die größte Kininogenanreicherung fand sich in den Fraktionen, die Ammoniumsulfatkonzentrationen von 49 - 57% gewonnen worden waren. Nach Vereinigung dieser Fraktionen, Entsalzung durch Dialyse und Lyophilisation erhielten wir ein auf 3,0 KI / mg Protein angereichertes Material.

Mit diesem Material machten wir in Harzrührversuchen nochmals Stabilisierungsversuche mit den vorhergeschilderten Hemmstoffen. Doch auch mit diesem angereicherten Material wurden bei Kontakt mit dem Ionenaustauscher wieder ca. 50% inaktiv. In weiteren Versuchen stellten wir fest, daß auch bei der Dialyse gegen fließendes Leitungswasser nochmals ein Teil des schon mit Ionenaustauschern in Berührung gekommenen Materials inaktiv wird. Die Verluste liegen bei etwa 10 - 30 % des dialysierten Materials.

Die Ursachen der Kininogen bzw. Kininverluste bei Versuchen Kininogen rein herzustellen sind nach den dargestellten Befunden nur zum Teil auf enzymatische Vorgänge zurückzuführen. Verluste treten auch nach Beseitigung enzymatisch bedingter Abbauvorgänge auf.

Um den Ursachen dieser unspezifischen Abbauvorgänge auf die Spur zu kommen, versuchten wir aus unserem am höchsten angereicherten Produkten Kinin freizulegen. Wir verwendeten hochangereichertes Schweinepankreaskallikrein zur Liberierung. Dieses Präparat war frei von Kininaseaktivität. Beim Verfolgen der Kininliberierung stellten wir fest, daß nach kurzer Zeit das Maximum an freilegbarem Kinin erreicht ist, daß jedoch sofort ein erheblicher Abfall der Kininaktivität in den Inkubationsansätzen eintrat. Die gleichen Verhältnisse fanden wir auch, wenn das Kininogenpräparat durch Erhitzen oder durch Perchlorsäurefällung von Kininasen befreit wurde.

Wir versuchten trotzdem das Reaktionsprodukt der Kallikrein-einwirkung zu isolieren. Dazu wurden die Spaltansätze durch Perchlorsäurefällung von der Hauptmenge der hochmolekularen Proteine befreit und der kininenthaltende Überstand nach pH-Umstellung an Sephadex G-75 fraktioniert. Dabei gelingt die Abtrennung nicht fällbarer Proteine von der Kininaktivität. Bei diesem Vorgang fällt die Kininaktivität auf etwa 10% des Ausgangswertes. Die Kininfraktion wurde an Sephadex G-25 entsalzt.

Die papierchromatographische Reinheitsprüfung zeigte einen einheitlichen Fleck.

Nach saurer Hydrolyse wurde die Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Bei Bezug der Werte für die einzelnen Aminosäurereste auf Glycin = 1 ergibt sich folgende Zusammensetzung für das Peptid :

Gly (1,00); Ser (1,0); Pro (2,87); Phe (1,45);
Lys (0,58); Arg (0,18)

Die Analyse zeigt, daß nach der Liberierung des Kininogens ein erheblicher unspezifischer Abbau des Kinins eintritt, der nur ein Restmolekül des ursprünglichen Kinins , begrenzt durch Prolinreste übrigläßt, wie die Formel zeigt :

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

II. Beschreibung der Versuche :

1. Material und Methoden zur Isolierung des polyvalenten Proteaseninhibitors aus Kartoffeln :

a, Material : Trypsin: Trypure Fa.Novo,
Substrat: Nα-Benzoyl-arginyl-p-nitro-anilid
Sephadex G-75 medium, DEAE-Cellulose Serva
Trypsinharz (s.L. 51)

b, Bestimmungsmethoden : Die Trypsinhemmung wurde an Hand der 50proz. Hemmung von Trypsin nach der standardisierten Methode von Fritz und Mitarb.(52) bestimmt.

c, Darstellung des Inhibitors : Für die Anreicherungsversuche genügt roher Kartoffelsaft. Inhibitorhaltige Lösung wird von homogenisierten, gewaschenen Kartoffelknollen nach Entfernung von festen Bestandteilen gewonnen. Nach Einstellung auf pH 8 kann die Lösung in diesem Zustand zum Serum für die Ammoniumsulfatfällung zugefügt werden. Bei weiteren Reinigungsschritten mit den erhaltenen Kininogenpräparaten durch die Säulenchromatographie wird hochgereinigter Inhibitor verwendet. Die Isolierung geschieht durch selektive Adsorption des Inhibitors an wasserunlösliche Trypsinharze. Nach Zentrifugation des Kartoffelhomogenates wird der Überstand auf pH 8 eingestellt und Trypsinharz eingerührt. Durch laufende Inhibitorbestimmungen im Überstand wird die Sättigungsgrenze des Harzes bestimmt. Das Harz wird abzentrifugiert und der Überstand für eventuelle neue Beladung aufbewahrt. Nach gründlichem Waschen des Harzes mit Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 8, wird der Inhibitor mit 6 N Harnstofflösung bei pH 2 eluiert,

das Eluat neutralisiert und der Harnstoff durch Dialyse entfernt.(53,54)
Sämtliche Beladungs und Elutionsvorgänge erfolgten bei 0°C. Das Eluat wird eingeengt und über Sephadex G-75(Säule 2,5x40 cm) mit Wasser als Elutionsmittel entsalzt. Das lyophilisierte Material hat eine Inhibitoraktivität von 650 ImU/mg. Dieser Reinheitsgrad genügt für alle weiteren Isolierungsschritte unseres Kininogenpräparates.

Insgesamt wurden 5 kg Kartoffelknollen aufgearbeitet, wobei wir eine Inhibitormenge von 6,5 Millionen ImU erhielten.

2. Testung auf Kininogengehalt durch Freisetzung von Kinin mit Trypsin :

Der Nachweis der Kinine ist nur mit biologischen Methoden möglich und wird bevorzugt an glattmuskulären Organen durchgeführt. Der R a t t e n u t e r u s reagiert 1o mal empfindlicher das zur Testung sehr oft verwandte Meerschweinchenileum. Die geringsten am isolierten Rattenuterus noch testbaren Kinindosen liegen bei 0,02 Gamma.

a. Material : Uterus: von jungen, jungfräulichen Ratten(Gewicht 120 -160 g)
Jalonlösung: NaCl 9,0 g; KCl 0,4 g; CaCl 0,06 g; $NaHCO_3$ 0,5 g; Glukose 0,5 g/Liter
Synthetisches Bradykinin Sandoz

b, Methode : 0,5 ml der Lösung,bzw. 2 mg von Festsubstanzen, werden auf 2ml mit acqua dest. versetzt und nach Zufügen von 1Tropfen 2 N HCl 3 min.gekocht, um Kininogenasen und Kininasen zu zerstören. Hierauf wird im Wasserbad (20°) abgekühlt, mit 1 Tropfen konz. Thioglykolsäure versetzt und mit 4N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Mit TRA-Puffer pH 7,8 wird auf 9 ml aufgefüllt und dann mit 100 g Trypsin - durch Zufügen von 1 ml einer Trypsinlösung die 100 g/ml enthält- 20 min bei Zimmertemperatur zur Kininliberierung inkubiert.
Anschließend wird das Trypsin durch nochmaliges 3 min langes Kochen zerstört und die Lösung ist nach Abkühlen zur Testung bereit.

Durch wechselweise Injektion von Bradykininstandard und Testlösung in das Jalonbad, worin ein ca. zwei cm langes Stück eines Rattenuterushornes suspendiert und mit einem Faden an einem Hebelarm befestigt ist, der die Kontraktionen vergrößert auf einer berußten Trommel wiedergibt, werden Uteruskontraktionen ausgelöst.
Die Jalonbadtemperatur wird thermostatisch auf einem Wert von 30°C gehalten und die Badlösung dauernd durch Luftinsufflation oxygeniert.
Je nach Empfindlichkeit des Uterus werden Standardmengen von 0,01µg - 0,1µg injiziert.
Durch Variation von injizierter Menge an Standard und Testlösung werden gleiche Kontraktionswirkungen, d.h. gleiche U m k e h r - p u n k t e nach der ersten Kontraktion erzielt, sodaß dann nach dem Drei-Satz die in der Testlösung enthaltene Kinin bzw. Kininogenmenge errechnet werden kann, vgl. Abb.1

Nach Aufzeichnung des Umkehrpunktes wird das Uterusbad durch mehrmaliges Spülen mit Jalonlösung von kininaktiven Substanzen befreit und der Uterus ist nach etwa 4 min für die nächste Injektion bereit.

c, Empfindlichkeit : Biologische Teste mit isolierten Organen glatter Muskulatur sind sehr anfällig in ihrer Genauigkeit bei Änderung biologischer und physikalischer Parameter. Die Muskelpräparate im Frühjahr z.B. zeigen sehr oft starke, spontane Kontraktionen, bekannt als "spring fever" vor allem bei Ratten. Ionenstärke, pH-Wert, Calciumkonzentration, Sauerstoffsättigung und Temperatur des Jalonbades für den Rattenuterus sind physikalische Parameter. Als weiterer Faktor bei den Testungen ist zu beachten, daß verdünnte Bradykininstandardlösungen ziemlich unstabil sind und nach eignen Testungen innerhalb 6 Std bis zu 50% ihrer Aktivität verlieren können. Wir setzten deshalb bei unseren Testungen 2-stündlich eine neue Standardlösung an.

Bei Ausschaltung aller oben genannten Fehlerquellen für Fehltestungen ist eine Fehlerbreite von ± 10% nicht auszuschließen.

3. Ammoniumsulfatfällung :

Die Fraktionierung von Serumeiweißkörpern durch Aussalzen mit Neutralsalzen war eine der ersten Trennungsmethoden für Serumproteine. Aussalzmethoden sind einfacher als Fällungsmethoden mit Hilfe organischer Lösungsmittel und zudem schonender.
Am häufigsten wird dabei wegen seiner guten Löslichkeit und seines guten Aussalzeffektes, hauptsächlich zur präparativen Trennung, Ammoniumsulfat verwendet.

Vorgang: 4000 ml Rinderserum werden pro Ansatz mit 400 ml Kartoffelsaft (= 200000 ImU) und 3600 ml Boratpuffer 0,05 M pH 7,5 versetzt. Dazu wird unter Rühren aus einem Vorratsgefäß durch eine Kapillare gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben, bis zu einer Ammoniumsulfatkonzentration von 34 %. Nach Zentrifugation wird der Niederschlag verworfen, der Überstand durch 30%ige Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt. Durch Zugabe von weiteren 8000 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung durch eine Kapillare unter ständigem Rühren wird eine Ammoniumsulfatsättigung von 66% erreicht. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Der Niederschlag enthält die Hauptmenge von Kininogen. Er wird in 400 ml Boratpuffer 0,05 M pH 7,5, enthaltend 50 ml Kartoffelsaft (= 25000 ImU), gelöst und zur Dialyse gegen fließendes Leitungswasser gegeben. Nach der Dialyse werden noch ausgefallene Eiweißstoffe, z.B. restliches Fibrin abzentrifugiert. Die braune Lösung ist zur Weiterreinigung über Sephadex bereit.

4. Reinigung über Sephadex G-75 :

Im chromatographischen Vorgang der Gelfiltration werden Größenunterschiede der verschiedenen Moleküle zu ihrer Trennung ausgenutzt. Große Moleküle wandern dabei schneller als kleine Moleküle, die in einem von ihrer Größe abhängigem Maß in die Gelpartikel eindringen. So erhält man in Reihenfolge der Molekülgröße abnehmende Eiweißfraktionen bei der Eluierung.

Sephadex Gel Typ 75 hat einen Fraktionierbereich von MG 3000 - 70000 . Das ist der geeigneteste Trennbereich zur Isolierung von Kininogen.
Bei Vorversuchen in kleinen Säulen ergab sich bei Prüfung auf die kininogenhaltige Fraktion, daß das Kininogen in den Coeruloplasminhaltigen Fraktionen enthalten ist , die grün gefärbt sind.

Die präparative Aufarbeitung ist deshalb einfach, da nicht mehr getestet werden muß. Alle grüngefärbten Fraktionen werden gesammelt.

Vorgang : 3 Säulen (200x6 cm) werden mit gewaschenem Sephadex G-75 gefüllt. Pro Säule werden 100 ml der bei der Ammoniumsulfatfällung gewonnen Lösung aufgetragen. Laufpuffer ist ein 0,1mBorat + 0,1mNaCl pH 7.5.
Kininogenhaltige Fraktionen, erkennbar an der Grünfärbung durch Coeruloplasmin, werden vereinigt, das Material gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und gefriergetrocknet.
Aus dem erhaltenen Material sind 0,9 KI / mg Protein liberierbar.

Durch Rechromatographie dieses Materials nach der beschriebenen Methode erhalten wir Material, aus dem 1 , 2 KI / mg Eiweiß freilegbar sind.

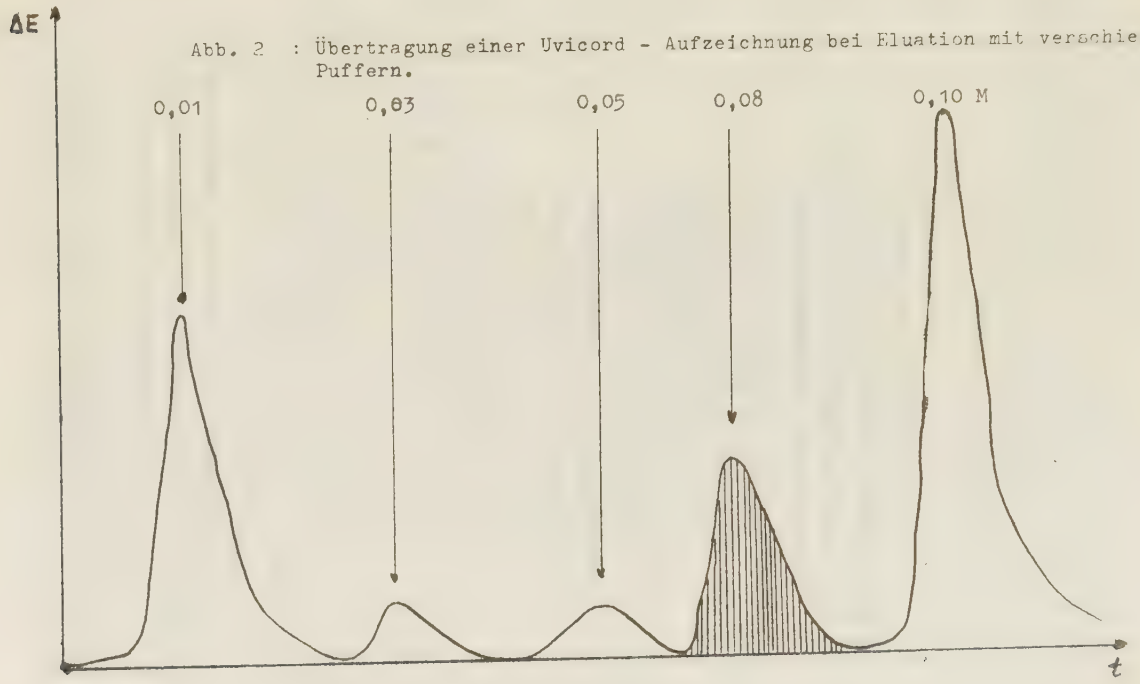
5. Anreicherungsversuch über DEAE- Cellulose :

Da durch Variation der Säulenlänge und des Geltyp's durch Gelfiltration keine rentable Anreicherung mehr zu erzielen war, versuchten wir weiter über Ionenaustauscher zu trennen.

Das Trennprinzip bei einam Ionenaustauschprozeß ist eine reversible Adsorption auf Grund von Ionenbeziehungen. Der Ionenaustausch wird dabei in zwei Schritten ausgeführt. Zuerst werden die aufgegebenen Substanzen an den Austauscher gebunden, in einem zweiten Schritt werden sie dadurch voneinander getrennt, daß sich ihre Komponenten infolge ihrer adsorptiven und elektrischen Eigenschaften unterscheiden. Zum Ablösen genügt es die Salzkonzentration oder den pH-Wert des Trennmediums zu ändern.
Nach Vorversuchen zeigte sich DEAE-Cellulose am geeignetsten für unser Präparat.

Vorgang : Eine Säule (40x2,5) wird mit DEAE-Cellulose(Serva), suspendiert in Boratpuffer 0,01 M pH 8,0, gefüllt und mit dem gleichen Puffer äquilibriert. 5 g Kininogenlycphilisat werden in 20 ml Boratpuffer 0,01 M pH 8,0 gelöst und 12 Std. gegen den gleiPuffer dialysiert. Die Kininogenlösung wird auf die Säule aufgetragen und mit konstantem Puffergradienten 0,01, 0,03, 0,05, 0,08, 0,10 M Boratpuffer pH 8,0 eluiert.
Die durch 0,08 M Puffer eluierte Fraktion enthält Kininogen. Die Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Kininogenmenge betrug 40%.
Abb.2 zeigt eine Eluationskurve, aufgezeichnet mit einem Uvicord, die Kininogenhaltige Fraktion ist schraffiert eingezeichnet.

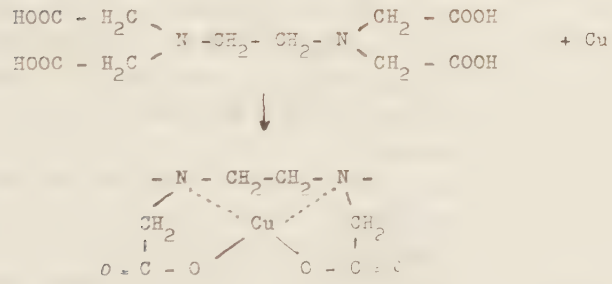
Abb. 2 : Übertragung einer Uvicord - Aufzeichnung bei Eluation mit verschiedenen Puffern.



6. Stabilisierungsversuche mit Metallkomplexbildnern :

Wird der Abbau von Kininogen während der Säulenchromatographie mit DEAE-Cellulose durch Metalloenzyme bewirkt, so wäre bei Zugabe Metallkomplexbildnern eine Verhinderung des Kininogenabbau's zu erwarten.

a, Äthylendiamintetraaessigsäure EDTA bildet Metallionenchelate :



Vorgang : 500 mg Kininogen werden in 20 ml Acqua dest. gelöst und 12 Std. in 0,01 M Boratpuffer pH 8,0 mit 0,005 M EDTA-Zusatz dialysiert,
Die Kininogenlösung wird auf die Säule aufgegeben wie in Punkt 5 beschrieben und mit konstantem Puffe gradienten 0,01, 0,05, 0,08, 0,10 Boratpuffer pH 8,0 + 0,005 M EDTA

Das mit 0,08 M Borat eluierbare Material war kininogenhaltig. Ausbeute 45% .

b, Phenanthrolin , ebenfalls ein Metallkomplexbildner ist als starker Kininasehemmstoff im Plasma beschrieben worden.(55) Unter gleichen Versuchsbedingungen wie oben setzten wir den Laufpuffern anstelle von EDTA Phenanthrolin in einer Konzentration von 0,25 g/l zu. Das mit 0,08 M Borat eluierte Material war kininogenhaltig. Ausbeute 50% .

7. Stabilisierungsversuch durch Schwermetallionenzusatz:

Schwermetalle reagieren besonders mit SH-Gruppen nach der Gleichung:

$$2\ R\text{-}SH + Me\langle^{OH}_{OH} \longrightarrow (R\text{-}S)_2\ Me + H_2O$$

So werden Eiweißstoffe mit SH-Gruppen, wie Kininasen gehemmt.

Vorgang: Stammlösungen von den Schwermetallsalzen CdCl, HgCl, PbCl (Merck AG Darmstadt pro analysi) werden hergestellt und den Säulenlaufpuffern in einer Molarität von 0,001 M zugesetzt. Die entstandene Trübung wird abgefiltert und die Säulen eluiert.

In einem ersten Säulenlauf wurden 500 mg Kininogen, gelöst in 20 ml acqua dest. und 12 Std. gegen den Startpuffer 0,01 M Borat pH 8,0 mit 0,001 M Schwermetallionenzusatz, mit konstantem Puffergradienten 0,01, 0,08, 0,10 + 1,0 NaCl, Boratpuffer pH 8,0 eluiert. Die durch 0,10 Borat und 1,0 NaCl eluierte Fraktion enthält Kininogen. Ausbeute 40%.

In einem zweiten Säulenlauf wurden 1000 mg Kininogen wie beschrieben vorbehandelt und mit einem flacheren Puffergradienten mit folgenden Laufpuffern eluiert:

1. 0,01 Borat
2. 0,05 Borat
3. 0,08 Borat
4. 0,10 Borat
5. 0,10 Borat + 0,05 NaCl
6. 0,10 Borat + 0,10 NaCl
7. 0,10 Borat + 0,20 NaCl
8. 0,10 Borat + 1,00 NaCl

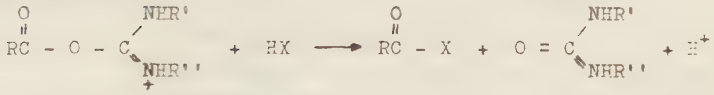
Kininogenhaltig waren die Eluate 4 und 5 .
Ausbeute 4 280KI, 5 180 KI = 46%

8. Stabilisierungsversuch durch Ausschalten der Wirkung von Carboxypeptidase B :

Die freie Carboxylgruppe wird durch ein wasserlösliches Carbodiimid aktiviert und reagiert dann mit einer nukleophilen Substanz wie Glycin- oder Leucinmethylester, die zugesetzt wird.nach folgendem Reaktionsschema :

I.

II.



a, Glycinmethylester :

Vorgang : 500 mg Kininogen werden in 50 ml acqua dest. gelöst und mit Glycinmethylesterhydrochlorid 1,0 M versetzt, auf pH 4,75 eingestellt. Unter Rühren wird N-Äthyl-NCarbodiimid 0,1 M zugegeben, wobei der pH-Wert konstant gehalten werden muß.
Nach 4-stündigem Rühren wird die Lösung 12 Std. gegen einen 0,01 M Boratpuffer pH 8,0 dialysiert. Bei der Eluation mit 0,01, 0,08, 0,10 Borat+ 1,00 NaCl war nur die letzte Fraktion kininogenhaltig
Ausbeute: 50%

b, Leucinmethylester :

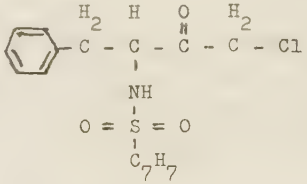
Vorgang w.o. , Ausbeute 45%

Reagentien waren alle von Merck AG Darmstadt, pro analysi.

9. Stabilisierungsversuch durch spezielle Inaktivierung chymotrypsinartiger Enzyme:

1962 beschrieben Günther Schöllemann und Elliot Shaw eine Methode zur speziellen Hemmung von Chymotrypsin. Es handelt sich dabei um die Blockierung der Serin-OH-Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms durch L-1-tosyl-amido-2-phenylethyl chloromethyl ketone TPCK.

TPCK



Vorgang : L-1-Tosyl-Amido-2-Phenyläthyl Chloromethyl Keton (Merck AG) wird 3 mM in folgend zusammengesetzten Puffer gelöst : 0,10 M Tris
0,05 M CaCl
0,05 M NaCl pH 7,2

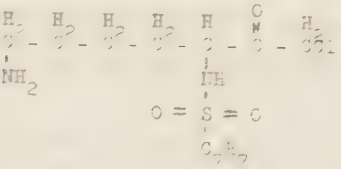
Anschließend werden 500 mg Kininogen 6 Std. in 20 ml obiger TPCK-Lösung gerührt. Diese Lösung wird dann vor Säulenaufgabe 12 Std gegen den Startpuffer dialysiert. Eluiert wurde bei dem ersten Versuch mit 0,01,0,08, 0,01 Borat + 1,0 NaCl. Die letzte Fraktion war Kininogenhaltig. Die Ausbeute betrug 60%.

In zwei weiteren Versuchen mit differenzierterem Puffergradienten wie bei dem Versuch mit Schwermetallionen wurde eine Ausbeute von 70% erzielt.

In einem vierten Versuch mit Schwermetallionenzusatz bei gleichem Puffergradienten, wie bei den vorhergehenden Versuchen betrug die Ausbeute 65%.

10. Stabilisierungsversuch mit TLCK :

TLCK ist wie das vorherbeschriebene TPCK ein Chloromethylketon folgender Struktur :



T L C K

TLCK inaktiviert Papain durch Reaktion mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins, nach Untersuchungen von Whitaker und Perez-Villasenor. Außerdem fand Shaw, daß es Trypsin durch spezifischen Angriff am Histidin des aktiven Zentrums von Trypsin.

Vorgang : TLCK wird wie im Vorversuch beschrieben behandelt und mit 500 mg Kininogen gerührt.
Unter den selben Bedingungen wie im vorhergenden Stabilisierungsversuch fanden wir keine Verbesserung der Ausbeuten an Kininogen :

1. Säulenlauf : 55%
2. Säulenlauf : 55%
3. Säulenlauf mit Schwermetallionenzusatz : 50%

11. Versuche, die einen enzymatischen Prozess bei der Inaktivierung ausschließen:

a, Synthetisches Bradykinin (Sandoz) wird mit kininogenhaltigem Eluat, das mit DEAE-Cellulose in Kontakt war inkubiert:

Es wird geprüft, ob Kinin inaktiviert wird. Dies ist nicht der Fall.

b, Kininogenlyophilisat, gewonnen nach Sephadex G-75 Filtration wird mit kininogenhaltigem Eluat, das mit DEAE-Cellulose in Kontakt war inkubiert.

Es wird geprüft, ob die Aktivität des Lyophilisates abnimmt. Dies ist nicht der Fall.

Vorgang : 0,1 ml einer synthetischen Bradykininlösung (Sandoz 0,1 mg/ml), was 10 KI entspricht , werden mit 5ml einer kininogenhaltigen Fraktion, nach Chromatographie an DEAE-Cellulose, inkubiert 3 Std. Anschließend wird durch Trypsin Kinin freigesetzt und am Rattenuterus die Aktivität der inkubierten Lösung getestet.
bzw. 10 mg des Kininogenlyophilisates werden auf obige weise behandelt.

c, Rühransätze von Kininogenlösungen lyophilisierten Materials werden den verschiedensten Bedingungen ausgesetzt. Glassplitterzusatz, Rühren bei Zimmertemperatur, bei 0°C, in Plastikgefäßen, mit Harzzusatz und ohne Harzzusatz.

Vorgang : Jeweils 10 mg des Kininogenlyophilisates nach Sephadexgelfiltration werden in 20 ml acqua dest. gelöst und mit den auszutestenden Substanzen 10 Std gerührt. Austestung erfolgt wie beschrieben.

d, Kininogenlösungen werden vor und nach Dialyse auf ihren Kininogengehalt ausgetestet, wobei 12 Std gegen fließendes Leitungswasser dialysiert wird.

12. Nochmalige Ammoniumsulfatabsalzung:

Nach Vorversuchen mit 1000 mg Kininogen wurden unter gleichen Bedingungen 10 g Kininogenlyophilisat nach Sephadex G-75 aufgearbeitet.

Ansatz: 10 g Kininogen werden in 334 ml 0,1 Boratpuffer pH 8,5 gelöst. Unter Rühren werden 166 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung durch eine Kapillare zugegeben. Die klare 33%ige Ammoniumsulfatlösung wird mit 2 N HCl auf pH 4,5 gestellt. Die nun trübe Lösung wird zentrifugiert. Der Niederschlag wird in 50 ml 0,1 Boratpuffer pH 8,5 aufgelöst und als Fraktion I bezeichnet. Der Überstand wird mit 2 N NaOH auf pH 6,0 zurückgestellt und unter Rühren mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Stufenweise wird so die Ammoniumsulfatkonzentration erhöht und bei eingetretener Trübung der Lösung wird jeweils zentrifugiert, 30 min bei 4500 U. Die Niederschläge werden w.o. beschrieben in 0,1 Boratpuffer gelöst. Insgesamt erhielten wir folgende Fraktionen:

		Kininogengehalt
I	33% ige Sättigung nach pH-Umstellung auf 4,5	
II	42% ige Sättigung bei pH 6,0	
III	45%ige	
IV	49% ige S.	2000 KI
V	53% ige S.	1800 KI
VI	57% ige S.	1800 KI
VII	61% ige S.	500 KI
VIII	68% ige S.	Ø

Alle Fraktionen waren Kininogenhaltig. Es wurden jedoch nur die Fraktionen IV, V u. VI mit dem deutlich höchsten Kininogengehalt gesammelt, und gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Aus dem erhaltenen Material wurde 5,6 KI/mg freigesetzt.

13. Rechromatographie an DEAE-Cellulose und nochmalige Stabilisierungsversuche durch Rühransätze mit den in Punkt 6 - 10 beschriebenen Substanzen:

Mit dem neuen angereicherten Material wurden nochmals teils Säulenversuche, teils Rührversuche mit Harz und Testsubstanzen ausgeführt, wie in den vorhergehenden Versuchen beschrieben.

Vorgang: Säulenversuch mit DEAE-Cellulose, Aufgabe von 250 mg des "neuen" Materials, wie in Punkt 5 beschrieben und Eluation.
Ausbeute 45%.

Vorgang: Rührversuche:
Jeweils 10 mg des angereicherten Materials werden mit 20 ml acqua dest. gelöst und mit den auf Stabilisierung auszutestenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen versetzt gerührt u. anschließend mit einer Spatelspitze DEAE-Cellulose versetzt. Gegen einen Leerwert werden nach Eluation der Lösungen vom Harz durch jeweiliges Rühren mit dem Eluationspuffer und anschließendes Zentrifugieren die einzelnen Fraktionen gewonnen und ausgetestet.

14. Freisetzung von Kinin und Aminosäurenanalyse .

5000 mg des nach der 2.Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Materials werden in 100 ml acqua dest. gelöst und bei pH 7,8 mit 5 mg hochgereinigtem Schweinepankreaskallikrein inkubiert. Die freigelegte Kininmenge wird alle 4 min. am Rattenuterus getestet. Nach etwa 12 min ist das Maximum an freigelegtem Kinin erreicht, die meßbare Kininaktivität wird geringer. Die Lösung wird nun sofort mit Perchlorsäure versetzt, sodaß eine Endkonzentration von 6% ig erreicht wird.
Nach Zentrifugation wird der klare Überstand, der kininhaltig ist auf Sephadex G 25 Säulen (150 cm lang 1,5 cm Ø) gegeben, um das kininaktive Peptid rein zu erhalten. Laufpuffer ist ein 0,05 TRA-Puffer pH 8,0. Die Eluate werden fraktioniert und auf Kinin getestet. Die kininhaltigen werden vereinigt. Anschließend wird die kininhaltige Fraktion über Sephadex G 25 Säulen (200 cm lang 1 cm Ø) mit Pyridin-Acetat-Puffer pH 3,1 entsalzt. Die Testungen ergaben, daß die kininhaltige Fraktion vor den salzhaltigen Fraktionen erscheint.
Die kininhaltigen Gläser werden vereinigt und durch Papierchromatographie im aufsteigenden System Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser 5:2:0,6:2,4 auf den Reinheitsgrad geprüft. Das Chromatogramm zeigte einen einheitlichen Fleck.
Die entsalzte Lösung wird eingedampft und durch mehrmaliges Waschen mit acqua dest. vom Pyridin befreit. Der Rückstand wird in 5 ml 6 N HCl gelöst und nach Einschmelzung in Hydrolyseröhrchen 24 Std. bei 110°C hydrolisiert.
Das Hydrolisat wird an Beckmann Unichrom Aminoacid-Analyser analysiert.

D : Zusammenfassung :

Kininogenlösungen, die man durch Fraktionierung ohne Denaturierung des Kininogens aus Serum gewinnt, sind instabil: Die durch Kininogenasezusatz, z.B. Trypsin, liberierbare Bradykininmenge nimmt stetig ab.

Nach der vorliegenden Untersuchung kann Kininogen bei der Ammoniumsulfatfraktionierung von Rinderserum durch Zusatz von Proteinase-Inhibitorlösungen aus Kartoffeln stabilisiert werden, wodurch eine starke Anreicherung von Kininogen ermöglicht wird. Bei Versuchen zu weiterer Anreicherung über Ionenaustauscher nimmt die aus den kininogenhaltigen Lösungen freilegbare Kininogenmenge wieder stark ab.

Es wurde zunächst vermutet, daß die bisher bekannten Kininogenasen und Kininasen des Serums an diesen Vorgängen beteiligt sind. Inhibitoren für diese Enzyme vermochten jedoch den Kininogenverlust nicht zu verhindern. Das Kininogen wird in unspezifischer Weise, d.h. ohne intermediäre Freisetzung von Kininen abgebaut. Aus dem am höchsten angereicherten Kininogen wurde durch hochgereinigtes Kallikrein aus Schweinepankreas Kallidin liberiert, das aber sofort an Aktivität verlor. Aus dem Reaktionsansatz konnte ein pharmakologisch inaktives Peptid isoliert werden, das folgende Aminosäuresequenz besaß : Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro.

Das Kallidin wird also durch einen noch unbekannten Katalysator rasch abgebaut, wobei die Arg-Pro-Bindung und die Pro-Phe-Bindung hydrolysiert werden, was die folgende Formel nochmals veranschaulicht.

Lys-Arg-|Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-| Phe-Arg

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s :

1. Werle,E.: Klin.Wschr.15,848(1936)
2. Werle,E., W.Götze und A.Keppler : Biochem.Z.289,217 (1937)
3. Rocha e Silva, M.,W.T.Beraldo und G.Rosenfeld: Am.J.Physiol.156,261 (1949)
4. Boissonas, R.,A.,St.Guttmann,P.A.Jaquenoud,H.Konzett und E. Stürmer. Experimantia 16, 326 (1960)
5. Nicolaides,E.D.,H.A.de Wald,P.G.Shorley und H.O.J.Collier : Nature 187,773 (1960)
6. Elliot,D.F.,G.P.Lewis und E.W.Horton: Biochem.Biophys.Res. Commun. 3,87 (1960)
7. Diniz C.R.,I.F.Carvalho : Ann.N.Y.Acad.Sc. 104,77 (1963)
8. Frey E.K.,H.Kraut u.E.Werle Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Ferdinand Enke Verlag Stuutgart 1967 S.57
9. Periti,P., A.Centaro,F.Sicuteri und B.Leocahi : Boll.Soc. Ital.Biol.sper. 38,672 (1962)
10. Werle,E.: in J.H.Gaddum: Polypeptides wich stimulate Plain Muscle,Livingstone Ltd. ,Edinburgh-London 1955,S.20
11. Scharnagel,K., und K.Greeff: Arch.exper.Pathol.Pharmakol. 253,81(1966)
12. Werle,E.,R.Kehl u.K.Koebke: Biochem.Z.320,372(1950)
13. Habermann,E.,W.Klett u.G.Rosenbusch: Arch.exper.Path.Parmakol. 332,121 (1963)
14. Trautschold,I.:Habilitationsschrift der Med.Fak.Univ.München 1965
15. Werle,E.,R.Kehl und K Koebke.ZBiochem.320,372 (1950)
16. Erdös,EG.:Adv.Pharmakol.4,1 (1966)
17. -38.
    Structure and function of Biologically active peptides : Bradykinin,Kallidin,and Congeners : Annals N.Y.Acad.of Sciences (1963) Volume 104

39. Cardoso, S.S.,D.S.Amorim,A.D.Noguerira,J.A.Alencar,A.P.Corrado und S.M. Rego : IIIrd International Pharmakological Congress, Sao Paolo 1966 Abstracts
40. Oates,J.A.,W.A.Pettinger und R.B.Doctor: J.Clin.Invest.45,173 (1966)
41. Marx,R.,P.Clemente,E.WerleUnd W.Appel:Blut 5367 (1959)
42. Habermann,E.,W.Klett und G.Rosenbusch : Z.physiol.Chem. 332,121 (1963)
43. Hochstraßer K.,und E.Werle Z.physiol.Chem.336,135 (1964)
44. Axen ,R,Gross.,Witkop,B.,Pierce,JV.,Webster,M.E.:Release of kininactivity from human kininogens and fresh plasma by cyanogen bromide Biochem.biophys..Res.Commun. 23,92 (1962)
45. Habermann ,E., u.J.Helbig:Arch.exper.Path.Pharmacol.255,20(1966)
46. Habermann,E. in Hdb.d.exp.Pharmakologie ,Bd.XXV S.251
47. Hochstraßer,K.u.Werle E.:Z physiol.Chem.346,299(1966)
48. Suzuki,T.,S.Iwanaga,S.Nagasawa und T.Sato: Tanabe Amino Acid Res.Found, Osaka Japan.Ann.Report 1965
49. Habermann,E.,W.Klett und G.Rosenbusch: Z.physiol.Chem.332,121 (1963)
50. Vogt,W.,G.Garbe und G.Schmidt: Arch.exper.Path.Pharmakol. 256,127 (1967)
51. Fritz H., Habilitationsarbeit Med.Fak.München 1968
52. Fritz H., u.Mitarb. Z.pysiol.Chemie 350 (1969)
53. Hochstraßer K., K.Illchmann u.E.Werle Z.physiol.Chem. 350,655 (1969)
54. Hochstraßer K., u.E.Werle Z.physiol.Chem.350,897 (1969)
55. E.Amundsen ,K.Nustad Brit.J.Pharmacol.(1964)23,440
56. Hochstraßer K, u E.Werle Z,physiol.Chemie350,897(1969)
57. Arms trong ,D., und J.W.Stewart: Nature 188,1193(1960)
58. Erdös,E.G., und E.M.Sloane: Biochem.Pharmacol.11,585(1962)
59. Ferreira,S.,H, und M.Rocha e Silva :Biochem.Pharmacol. 11,1123 (1962)
60. Aarsen,P.N. und A.Kemp: Brit.J.Pharmacol.19,442(1962)

61. Dyrüd,O.K.,F.R.Sisdel und K.B.Jensen:Acta Pharmacol.(Kbh.) 23,385 (1965)
62. Garbe G., und W.Vogt: Arch.exper.Path.Pharmakol,256,119(1967)
63. Erdös,E.G. :Adv. Pharmacol.4,1(1966)
64. Amundsen E.,u.K.Nustad, Brit.J.Pharmacol.(1964)23,440
65. Hoare D.G.,u.D.E.Koshland,Jr.,J.Biol.Chem.,242(1967)2447
66. Schoellmann,G.,u.E.Shaw Biochemistry 2,252 (1963)
67. Severin E.S. u. V.Tomasek, Bioch.a.Biophys.Res.Commun. Vol.20,No. 4,(1965) 496
68. Whitaker J.R.,u.J.Perez-Villasenor, Arch.Biochem.Biophys. 124,70 (1968)

Veronika Goßmann

München, den 1.6.1971

Lebenslauf :

Geboren am 6.April 1945 in Ottobeuren/Bayern

Eltern : Joseph Rudolph Goßmann Dr.med., Direktor der Chirurgischen Universitäts Kinderklinik München, gestorben 1957
Maria Goßmann, geb. Fey, Dr.med., Fachärztin für Anästhesie.

Familienstand : ledig

Ausbildungsweg :

1951 - 1955	Volksschule am Anger München
1955 - 1964	Humanistisches Gymnasium am Anger München
1964 - 1970	Medizinstudium in München
seit Aug.70	Medizinalassistent